

Acuicultura y pesca

Artículo de investigación científica y tecnológica

Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos

Biomass and protein production of *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) via the design of selective culture media

Produção de biomassa e proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) por meio de desenhos de meios de cultura seletivos

Ángel Darío González-Delgado,^{*1} Andrés Fernando Barajas-Solano,² Ana María Ardila-Álvarez³

¹ Docente de planta, Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería. Cartagena, Colombia.

Correo: agonzalezd1@unicartagena.edu.co. orcid.org/0000-0001-8100-8888

² Docente de planta, Universidad de Santander, Facultad de Ingenierías, Grupo Ambiental de Investigación Aplicada (GAIA).

Bucaramanga, Colombia. Correo: an.barajas@mail.udes.edu.co. orcid.org/0000-0003-2765-9131

³ Docente ocasional, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Programa de Ingeniería Ambiental. Bucaramanga, Colombia.

Correo: ana.ardila@unad.edu.co. orcid.org/0000-0002-1852-4350

Fecha recepción: 08/06/2016

Fecha aprobación: 30/01/2017

Para citar este artículo: González-Delgado, A. D., Barajas-Solano, A. F., & Ardila-Álvarez, A. M. (2017). Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 451-461

DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:736

* Autor de correspondencia

Resumen

En los últimos años se ha vuelto cada vez más frecuente el uso de medios de cultivo basados en fuentes de fósforo, nitrógeno y microelementos como alternativa a los medios tradicionales. Por lo tanto, en este trabajo se diseñaron dos medios de cultivo mixotróficos con diferentes concentraciones de nitrato de sodio, fosfato de potasio, acetato de sodio y carbonato de amonio (estos últimos como fuente de carbono), a fin de evaluar la producción de biomasa y proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. Se realizaron diagramas de Pareto y superficies de respuesta a fin de conocer la influencia de las variables de estudio sobre la producción de proteínas. Los resultados mostraron que las mayores producciones de biomasa (3,72 para el cultivo con

acetato y 2,17 g/L para el cultivo con carbonato) están directamente relacionadas con el nitrato de sodio (1,96 mM) y el fosfato de potasio (2,11 mM). Además, los máximos porcentajes de proteínas obtenidos fueron 60 % y 34 % para los cultivos con acetato y carbonato, respectivamente, ambos con 2,94 mM de nitrato de sodio. Finalmente, con base en el diagrama de Pareto obtenido, se encontró que para el medio de cultivo con acetato no existieron variables significativas que influyeran sobre la producción de proteínas, mientras que, en el medio de cultivo con carbonato, el nitrato de sodio y el fosfato de potasio influyeron significativamente en la producción de este metabolito.

Palabras clave: análisis de datos, biomasa, microalgas, proteína total

Abstract

In recent years, it has become more frequent the use of alternative culture media that use phosphorus and nitrogen sources as well as microelements, instead of using the more traditional ones. Therefore, in this study two mixotrophic culture media were designed with different sodium nitrate, potassium phosphate and sodium acetate/ammonium carbonate concentrations as carbon source, to evaluate the biomass and protein production of the microalgae *Chlorella vulgaris* Beyerinck. A Pareto diagram and a response surface plot were generated in order to know the significant influence that the study variables have on protein production. The results showed

that higher biomass production (3.72 g/L for the culture with acetate and 2.17 g/L for the one with carbonate) are directly related to sodium nitrate (1.96 mM) and potassium phosphate (2.11 mM). In addition, the maximum protein values obtained were 60% and 34% for acetate and carbonate cultures, respectively, both with 2.94 mM of sodium nitrate. Finally, the Pareto diagram showed that for the culture based on acetate there was no significant variables that influenced protein production; whereas the culture with carbonate, sodium nitrate and potassium phosphate influenced significantly the production of this metabolite.

Key words: Data analysis, Biomass, Microalgae, Total protein

Resumo

Nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais frequente o uso de meios de cultura baseados em fontes de fósforo, nitrogênio e microelementos como alternativa para os meios tradicionais. Portanto, neste trabalho, foram desenhados dois meios de cultura mixotróficos para diferentes concentrações de nitrato de sódio, fosfato de potássio, acetato de sódio e carbonato de amônio (estes dois últimos como fonte de carbono), a fim de avaliar a produção de biomassa e de proteínas a partir da microalga *Chlorella vulgaris*. Foram realizados gráficos de barras (ou diagramas de Pareto) e superfícies de resposta para conhecer a influência das variáveis de estudo sobre a produção de proteínas. Os resultados mostraram que as maiores produções de biomassa

(3,72 para a cultura com acetato e 2,17 g/L para a cultura com carbonato) estão diretamente relacionadas com o nitrato de sódio (1,96 mM) e o fosfato de potássio (2,11 mM). Além disso, as máximas porcentagens de proteínas obtidas foram 60 % e 34 % para as culturas com acetato e carbonato, respectivamente, ambos com 2,94 mM de nitrato de sódio. Finalmente, com base no diagrama de Pareto obtido, constatou-se que, para o meio de cultura com acetato, não existiram variáveis significativas que influenciassem a produção de proteínas, enquanto, no meio de cultura com carbonato, o nitrato de sódio e o fosfato de potássio influenciaram significativamente a produção desse metabólito.

Palavras chaves: análise de dados, biomassa, *Chlorella vulgaris*, proteína

Introducción

Desde hace años, el cultivo de microalgas se ha llevado a cabo de forma natural o artificial en lagos, estanques abiertos o fotobiorreactores altamente complejos y controlados (Mata et al., 2016). En estos últimos, la energía de la luz es utilizada para generar reacciones metabólicas y así obtener productos como carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos, los cuales son útiles en el sector agrícola, la química verde y la bioenergía (Veronesi, Ida, D'Imporzano, & Adani, 2015).

Uno de los factores más importantes para lograr una producción de microalgas a escala comercial que sea económica y ambientalmente factible es el desarrollo de sistemas de cultivos sostenibles y rentables (Richmond, 2004), a partir de parámetros como el pH, la temperatura, la intensidad de la luz y la concentración de nutrientes (Moreno-Galván, Rojas-Tapias, & Bonilla, 2012).

Una alternativa viable para algunas especies es el uso de cultivos mixotróficos, en los que la cantidad de luz reduce la producción de CO₂ en comparación con los cultivos heterótrofos (Estévez, Barajas, Barajas, & Kafarov, 2013), además de inducir la producción de macromoléculas de alto valor, gracias al efecto regulatorio de la luz (Li, Xu, & Wu, 2007). Sin embargo, aunque este tipo de cultivo es económicamente viable, se requiere de una fuente de carbono de bajo costo y del conocimiento de las concentraciones de experimentación más favorables (Martins et al., 2016), debido a que ciertos cambios en los nutrientes del medio pueden aumentar o inhibir la tasa de crecimiento de las algas (Bhola et al., 2011; Estévez et al., 2013).

Tal es el caso del acetato, que en concentraciones por encima de 1 g/L puede inhibir el crecimiento debido a la intoxicación de las algas, mientras que en concentraciones más bajas estimula el crecimiento y la acumulación de lípidos (Degrenne et al., 2010). De forma similar, el nitrógeno puede incrementar la productividad en la composición de la biomasa, especialmente, de pigmentos y proteínas debido a que este elemento, en forma de nitrato, se asimila en

las células de la microalga y se emplea como fuente de nutrientes para mejorar su crecimiento (Devi, Subhash, & Mohan, 2012). Mientras que el fosfato, constituyente del adenosín trifosfato (ATP), aporta la energía necesaria para las actividades metabólicas y contribuye al crecimiento de la microalga.

Lo anterior permite concluir que la concentración de nutrientes en el medio de cultivo de las microalgas es un factor crítico para la obtención de metabolitos de valor agregado. Por tal razón, en este trabajo se diseñaron dos cultivos mixotróficos mediante la modificación simultánea de las concentraciones de nitrógeno y fósforo como fuentes de nutrientes en dos medios suplementados con carbono, a fin de evaluar la producción de biomasa y proteína en *Chlorella vulgaris*.

Materiales y métodos

Cultivo de microalga

Chlorella vulgaris Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae), adquirida del cepario de la Universidad de Texas, con código de cultivo UTEX 1803, se cultivó durante 15 días a 25±2 °C, pH 7, en medio Bold Basal modificado (Andersen, Berges, Harrison, & Watanabe, 2005), sin ningún suministro complementario de CO₂ y con iluminación de lámparas fluorescentes con un ciclo de luz-oscuridad 12-12 horas.

Se usaron biorreactores rectangulares en vidrio de 2 L (20 cm largo x 20 cm altura x 10 cm ancho), en cuyos extremos inferiores contaban con un suministro de aire continuo por burbujeo (tubo-difusor) con el fin de proveer aire a los cultivos y garantizar que todas las células estuviesen expuestas a la luz y a los nutrientes del medio.

Mejoramiento del cultivo

A fin de mejorar la producción de biomasa y proteínas, se plantearon cultivos mixotróficos con base en diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y dos fuentes de carbono: acetato de sodio

y carbonato de amonio. La concentración de los demás componentes macronutrientes y micronutrientes del medio se mantuvo constante según las especificaciones del medio Bold Basal modificado. La tabla 1 presenta la concentración de nitrato de sodio y fosfato de potasio para los cultivos suplementados con acetato de sodio. Este diseño experimental se fundamentó en una composición

central no factorial 3^3 realizada con el *software* Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004). Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado y tuvo una duración máxima de 15 días. Con la intención de obtener la mayor cantidad de datos estadísticamente viables de cada tratamiento (incluida su réplica), se tomaron muestras por duplicado.

Tabla 1. Diseño experimental para el medio de cultivo con acetato de sodio, nitrato de sodio y fosfato de potasio

| Tratamientos | Acetato de sodio (mM) | Nitrato de sodio (mM) | Fosfato de potasio (mM) |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | 10 | 2,94 | 0,57 |
| 2 | 10 | 0,98 | 1,72 |
| 3 | 30 | 2,94 | 1,72 |
| 4 | 30 | 0,98 | 0,57 |
| 5 | 20 | 1,96 | 1,15 |
| 6 | 10 | 2,94 | 1,72 |
| 7 | 10 | 0,98 | 0,57 |
| 8 | 30 | 2,94 | 0,57 |
| 9 | 30 | 0,98 | 1,72 |
| 10 | 3,27 | 1,96 | 1,15 |
| 11 | 36,73 | 1,96 | 1,15 |
| 12 | 20 | 3,6 | 1,15 |
| 13 | 20 | 0,32 | 1,15 |
| 14 | 20 | 1,96 | 0,19 |
| 15 | 20 | 1,96 | 2,11 |

Fuente: Elaboración propia

En el segundo medio de cultivo se empleó carbonato de amonio como fuente de carbono, y se mantuvieron constantes las concentraciones de nitrato y fosfato usadas en el primer experimento (tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental para el medio de cultivo con carbonato de amonio, nitrato de sodio y fosfato de potasio

| Tratamientos | Carbonato de amonio (mM) | Nitrato de sodio (mM) | Fosfato de potasio (mM) |
|--------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1 | 1,07 | 2,94 | 0,57 |
| 2 | 1,07 | 0,98 | 1,71 |
| 3 | 3,22 | 2,94 | 1,71 |
| 4 | 3,22 | 0,98 | 0,57 |
| 5 | 2,15 | 1,96 | 1,15 |
| 6 | 1,07 | 2,94 | 1,72 |
| 7 | 1,07 | 0,98 | 0,57 |
| 8 | 3,22 | 2,94 | 0,57 |
| 9 | 3,22 | 0,98 | 1,72 |
| 10 | 0,35 | 1,96 | 1,15 |
| 11 | 3,95 | 1,96 | 1,15 |
| 12 | 2,15 | 3,6 | 1,15 |
| 13 | 2,15 | 0,32 | 1,15 |
| 14 | 2,15 | 1,96 | 0,19 |
| 15 | 2,15 | 1,96 | 2,11 |

Fuente: Elaboración propia

Cuantificación de la biomasa

Para cada uno de los tratamientos se tomaron 5 mL de muestra durante los días 0, 2, 5, 7, 10 y 15 de cultivo, y se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Pharo300 Merck. Esta lectura A_{500} fue correlacionada contra una curva estándar

de cantidad de biomasa C_B (g/L), de acuerdo con la ecuación 1, la cual fue determinada a partir de biomasa seca del laboratorio. Con la intención de obtener datos estadísticamente fiables se realizaron duplicados por cada tratamiento (incluida su réplica).

$$C_B = 1,316 \times A_{500} + 0,173$$

Ecuación 1

Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron extraídas mediante el método propuesto por Rausch (1981) y empleado por Chen y Vaidyanathan (2012). El proceso fue realizado tres veces, las dos primeras a 80 °C y la última a 100 °C, a fin de extraer completamente las proteínas. Al final, las tres extracciones fueron combinadas y mezcladas antes del análisis. El contenido de proteínas totales en el extracto fue estimado por reacción de Folin-Ciocalteu (Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall, 1951), sistema empleado por Dorey y Dravez (1998). Finalmente, la concentración de proteínas en la muestra se estimó por lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm. El cálculo del contenido de proteínas en mg de BSA/L se obtuvo a partir de la correlación contra una curva de calibración de solución de proteínas estándar (García-Martínez et al., 2016).

Con la intención de obtener datos estadísticamente fiables se realizaron duplicados por cada tratamiento (incluida su réplica).

Análisis estadístico

Se realizaron diagramas de Pareto con el *software* Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004), para conocer la influencia significativa positiva o negativa de las variables de estudio sobre los datos obtenidos con el diseño de experimentos, y se tuvo en cuenta que, cuando las variables cruzan el umbral, existe significancia con un valor $p < 0,05$. Además, se realizaron diagramas de superficie de respuesta de acuerdo con los resultados arrojados por los diagramas de Pareto, y se mantuvieron constantes las mejores

condiciones de experimentación, a fin de observar el efecto que tienen las interacciones entre las variables significativas sobre la producción de proteínas.

Resultados y discusión

Concentración de biomasa

En la figura 1 se presenta la máxima concentración de biomasa obtenida en cada experimento (concentración inicial de 0,2 g/L), en función de la concentración de los nutrientes del cultivo. Se observa que, después de quince días de cultivo con diferentes concentraciones de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, en el tratamiento T15 para los experimentos con acetato de sodio y con carbonato de amonio se obtuvieron las mayores concentraciones de biomasa (3,7 y 2,2 g/L respectivamente). De acuerdo con los resultados reportados por Heredia-Arroyo, Wei y Hu (2010) y por Quiao y Wang (2009), el acetato de sodio afecta positivamente la producción de biomasa de especies de *Chlorella*. Por otra parte, los valores encontrados en este estudio son superiores a los descritos por Devi et al. (2012), quienes reportaron una concentración máxima de biomasa de 1,69 g/L en un cultivo con mecanismo heterotrófico que combinó la modificación de carbono, fósforo y nitrógeno. Así mismo, los estudios de Li et al. (2007) mostraron que la concentración de la biomasa se duplicó cuando el nitrógeno en el medio se agotó. En el presente estudio, las mayores producciones de biomasa se obtuvieron con una concentración de 1,96 mM de nitrato de sodio y altas concentraciones de fosfato (2,11 mM) para ambos experimentos.

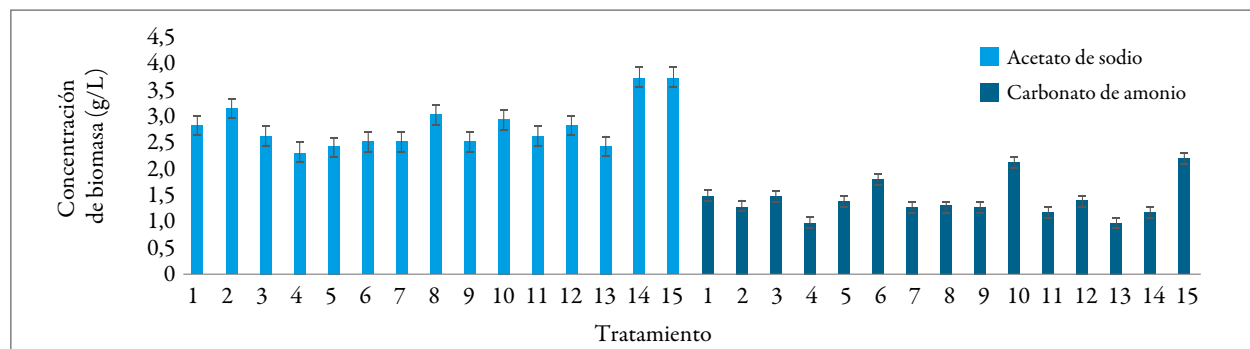


Figura 1. Concentración de biomasa después de 15 días.

Fuente: Elaboración propia

Producción de proteínas

Durante los primeros días de cultivo se obtuvo una baja producción de proteínas con algunos tratamientos, debido a que las microalgas suelen presentar cambios en la composición interna a

raíz de la adaptación al nuevo medio de cultivo (Chiranjeevi & Mohan, 2016). La figura 2 muestra el contenido de proteínas totales para cada uno de los experimentos; la mayor producción de proteínas totales se obtuvo en los tratamientos con concentraciones de nitrato de

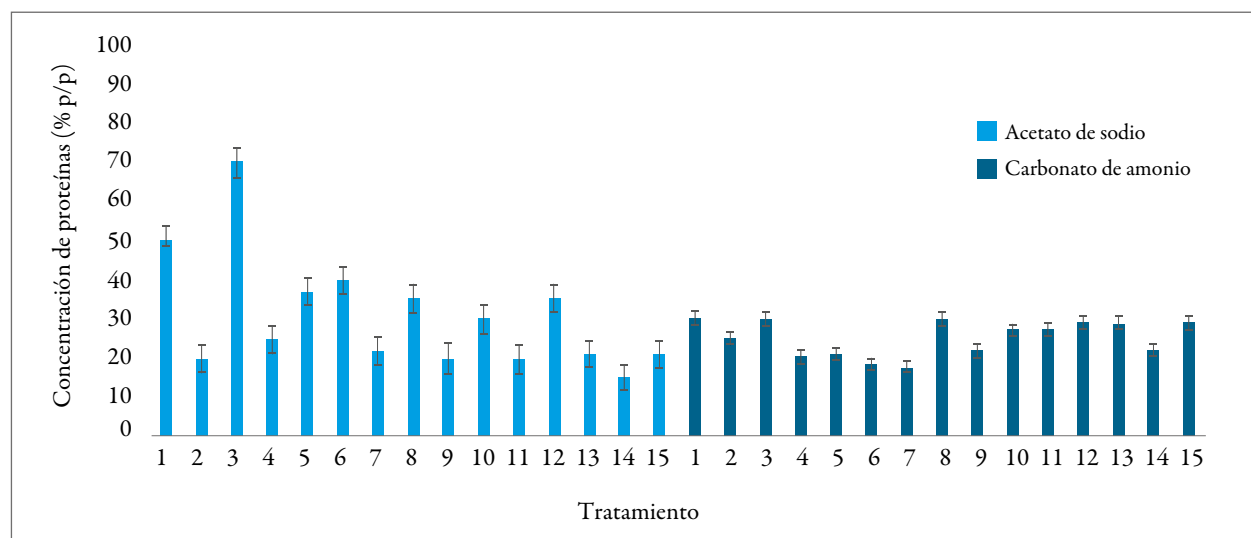


Figura 2. Concentración final de proteínas después de 15 días.

Fuente: Elaboración propia

La concentración de proteínas obtenidas en los experimentos resultó ser mayor a la presentada por Yanna, Nicolas, & Yi (2009), quienes obtuvieron una concentración máxima de proteínas correspondiente al 32 % de la biomasa, empleando glucosa al 1 % p/v. Sin embargo, Uslu, Isik, Koç, & Göksan (2011) reportaron un aumento en el contenido de proteínas de 8 % a 54 % mediante el aumento en la concentración de nitrógeno, y Porras y Prada (2012) reportaron un rendimiento del 54 % p/p. En la figura 2 también se observa que, para los cultivos suplementados con carbonato de amonio y nitrato de sodio, la mayoría de los tratamientos obtuvo un contenido de proteínas superior al 28 % en la biomasa. En contraste, los estudios realizados por Uslu et al. (2011) indicaron que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo causa una reducción en el contenido de proteínas de 53,5 a 5,6 %. Otros autores, como Bulut (2009), diseñaron medios de cultivo con deficiencia de nitrógeno y fósforo, y reportaron el menor contenido de proteínas

en *C. vulgaris* (13,01 %) en el cultivo con menor concentración de nitrógeno.

En el diagrama de Pareto de la figura 3A, se observa que en los experimentos realizados con acetato de sodio no existen variables significativas que influyan sobre la producción de proteínas. Mientras que la figura 3B muestra que, para el cultivo con carbonato de amonio, la concentración de nitrato de sodio (5,51497) ejerce una influencia significativa positiva en la producción de proteínas, es decir, a mayor concentración de nitrato, se obtiene una mayor cantidad de este metabolito. Así mismo, el fosfato de potasio ejerce una influencia significativa negativa (-3,22543), pues, a bajas concentraciones de este, se favorece la producción de proteínas. Por último, los resultados demuestran que la fuente de carbono (ya sea acetato o carbonato) no es una variable importante en la deposición de proteínas, aun cuando el carbonato de amonio puede aumentar la concentración final de nitrógeno.

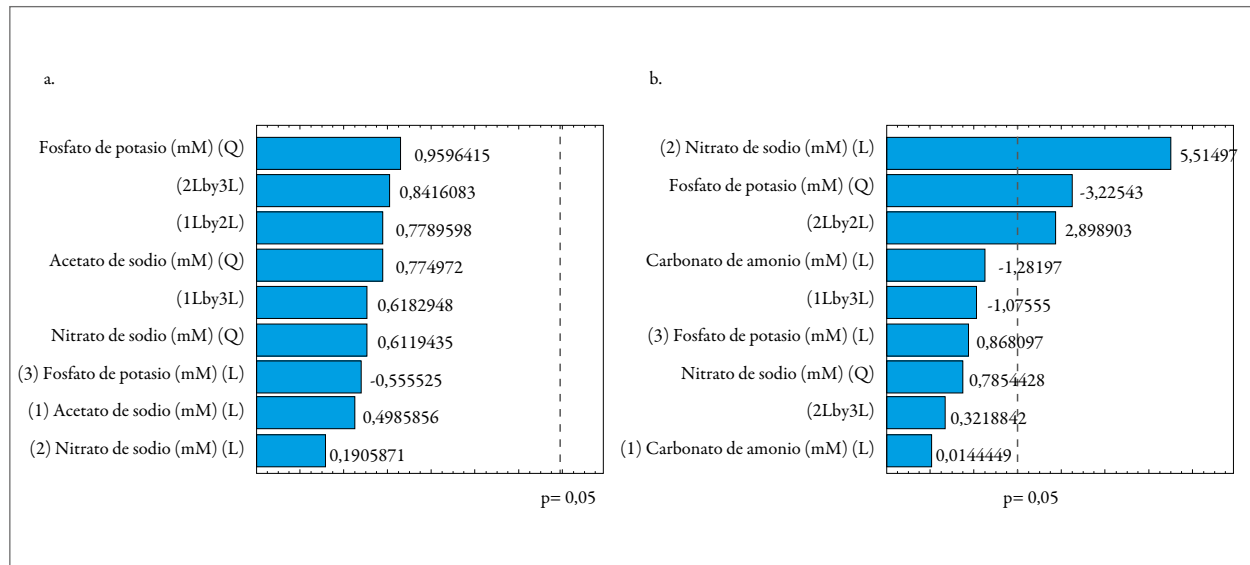


Figura 3. Diagrama de Pareto obtenido con base en la producción de proteínas. a. Acetato de sodio; b. Carbonato de amonio.

Fuente: Elaboración propia

La superficie de respuesta presentada en la figura 4a para la producción de proteínas con acetato de sodio muestra que la mayor producción (1 g/L) se obtiene con 36,73 mM de acetato, 3,6 mM de nitrato y 2,11 mM de fosfato. Sin embargo, pueden obtenerse concentraciones superiores de proteínas usando concentraciones más altas de

acetato, nitrato y fosfato. Fábregas, Abalde, & Herrero (1989) realizaron estudios en los que se evidenció que una variación en la concentración de nitrato de sodio influye en la producción de proteínas, de manera que esta última siempre será proporcional al nitrato usado como fuente de nitrógeno.

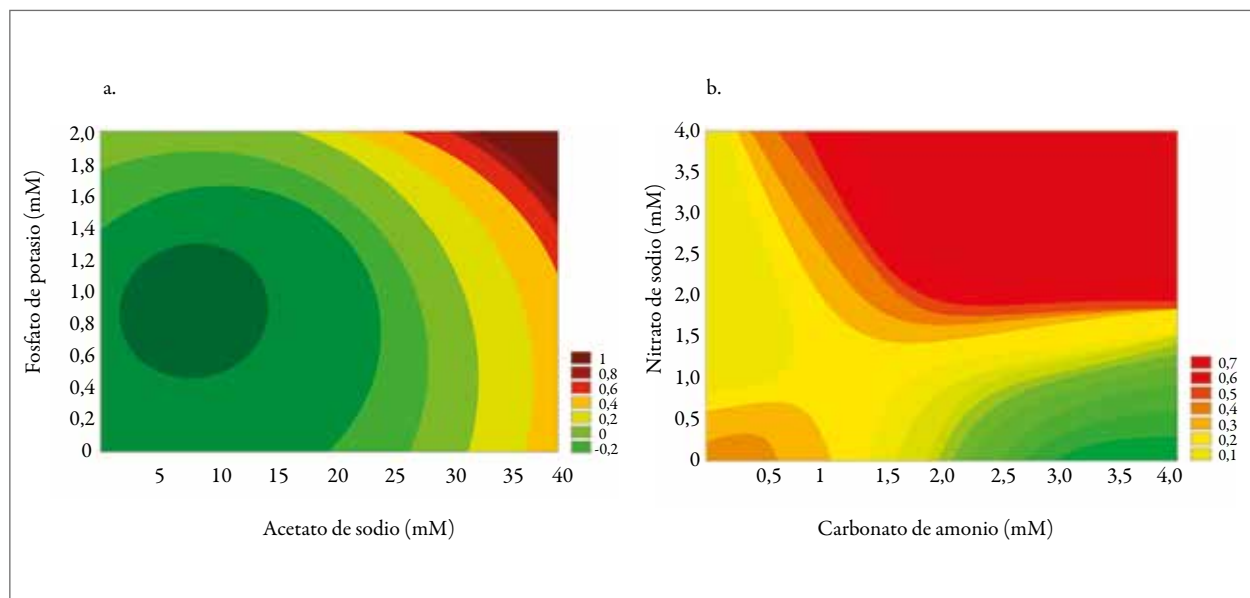


Figura 4. Superficie de respuesta para la producción de proteínas. a. Acetato de sodio; b. Carbonato de amonio.

Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, la figura 4b permite observar que la mayor concentración de proteínas (0,5 g/L) se obtuvo con cantidades de 3,947 mM de carbonato de amonio, 3,6 mM de nitrato de sodio y 1,147 mM de fosfato de potasio. Además, las concentraciones de carbonato de amonio y de nitrato de sodio son directamente proporcionales a la producción de proteínas totales en la biomasa. Este resultado concuerda con los estudios realizados por Ördög, Stirk, Balint, Van Staden, & Lovasz (2012), quienes reportaron un incremento en la concentración de proteínas los días en que se contaba con una mayor reserva de nitrógeno.

Conclusiones

En este estudio, la utilización de dos cultivos mixotróficos con diferentes concentraciones de fuentes de nutrientes permitió evaluar la producción de biomasa y proteínas de *C. vulgaris*. A partir de los resultados, se concluye que el cultivo suplementado con acetato de sodio llevó a la obtención de la mayor producción de biomasa (3,7 g/L) y de proteínas (60%). Sin embargo, el diagrama de Pareto permitió observar que para este medio de cultivo no existieron

variables significativas que influyeran sobre la producción de proteínas, mientras que, para el medio de cultivo con carbonato, el nitrato de sodio y el fosfato de potasio influyeron de manera directa e inversamente proporcional sobre la producción de este metabolito, respectivamente. En general, los resultados demuestran el potencial que tienen las microalgas como fuente principal de materia prima de una biorrefinería basada en cultivos mixotróficos, para la obtención de productos de alto valor agregado.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena, la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) y la Universidad de Santander (UNDES) por el suministro de los equipos, reactivos, materiales y el *software* necesarios para concluir satisfactoriamente esta investigación.

Descargos de responsabilidad

Los autores están de acuerdo con la publicación del presente artículo y declaran que no existe ningún conflicto de interés que afecte los resultados.

Referencias

- Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J., & Watanabe, M. M. (2005). Appendix A. Recipes for freshwater and seawater media. In R. A. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S., Subburamu, K., Sanniyasi, E., & Bux, F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), 377-382.
- Bulut, Y. (2009). *The investigations on the possibility of increase lipid content of Chlorella* (Master's thesis). University Cukurova, Turkey.
- Chen, Y., & Vaidyanathan, S. (2012). A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids. *Analytica Chimica Acta*, 724, 67-72.
- Chiranjeevi, P., & Mohan, S. V. (2016). Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renewable Energy*, 98, 64-71.
- Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J. F, Cogne, G., & Legrand, J. (2010). Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 19741-10749.
- Devi, M. P., Subhash, G. V., & Mohan, S. V. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276-283.
- Dorey, C. R., & Dravez, J. A. (1998). *Quantitative analysis laboratory: a new approach* (Laboratory manual). Conway, AR: University of Central Arkansas.
- Estévez, L., Barajas, A., Barajas, C., & Kafarov, V. (2013). Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(2), 113-126.
- Fábregas, J., Abalde, J., & Herrero, C. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83(3-4), 289-304.
- García-Martínez, B., Ayala-Torres, E., Reyes-Gómez, O., Zuorro, A., Barajas-Solano, A., Barajas-Ferreira, C. (2016). Evaluation of a two-phase extraction system of carbohydrates and proteins from *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 355-360.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., & Hu, B. (2010). Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(7), 1978-1995.
- Li, X., Xu, H., & Wu, Q. (2007). Large scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 764-771.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Martins, A., Mata, T., Oliveira, O., Oliveira, S., Mendes, A., & Caetano, N. (2016). Sustainability evaluation of biodiesel from *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris* under mixotrophic conditions and salinity stress. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 571-576.
- Mata, T., Martins, A., Oliveira, O., Oliveira, S., Mendes, A., Caetano, N. (2016). Lipid content and productivity of *arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris* under mixotrophic conditions and salinity stress. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 187-192.
- Moreno-Galván, A., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2012). Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la multiplicación de *Azospirillum brasilense* C16 mediante diseños estadísticos secuenciados. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 201-206.
- Ördög, V., Stirk, W., Balint, P., Van Staden, J., & Lovasz, C. (2012). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 907-914.
- Porras, T., & Prada, C. (2012). *Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en Chlorella vulgaris UTEX 1803* (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Qiao, H., & Wang, G. (2009). Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 762-768.
- Rausch, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass: Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiology*, 78, 237-251.
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiology*, 512(1), 33-37.
- StatSoft Inc. (2004). *Statistica 7.0*. Oklahoma: StatSoft.
- Uslu, L., Isik, O., Koç, K., & Göksan, T. (2011). The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 386-389.
- Veronesi, D., Ida, A., D'Imporzano, G., & Adani, F. (2015). Microalgae cultivation: nutrient recovery from digestate for producing algae biomass. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 1201-1206.
- Yanna, L., Nicolas, S., & Yi, C. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043-1049.